

福尔马林固定白 豚标本 DNA 提取及其遗传多样性的初步研究

许黎美^{1,3} 万秋红² 王 丁

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 浙江大学濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室, 杭州 310029;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 福尔马林固定标本是宝贵的遗传资源, 但是如何有效利用其中的遗传信息一直存在问题。本文尝试从标本预处理、消化、PCR 扩增各方面综合考虑和优化改进, 成功提取并扩增 21 头福尔马林固定白 豚标本线粒体 DNA 控制区 410 bp 片段。采用了 3 种预处理方法尽量去除固定标本中残存的甲醛, 从试验结果来看, 从酒精梯度+ 临界点干燥处理的标本中提取的 DNA 在扩增时具有明显优势。通过蛋白酶 K 消化过程中对于酶的浓度、温浴时间的比较试验, 发现随着采用大幅提高酶浓度、延长消化时间等高强度的蛋白酶消化操作后, DNA 的质量和产量均得到显著提高。针对标本 DNA 降解严重的特点, 设计特异性好且长度合适的引物以及使用巢式引物扩增, 均提高了标本 DNA 扩增的特异性和灵敏度。通过对所测得的 21 头白 豚线粒体 DNA 控制区部分序列的对比, 发现全部个体在该片段上的序列完全一致, 说明白 豚遗传多样性极低。

关键词: 福尔马林固定标本; DNA 提取; 白 豚; 遗传多样性

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A

文章编号: 1009-3207(2005)03-0272-07

研究一个物种的遗传物质, 首先必须获得该物种的个体或组织材料。自从 20 世纪以来, 随着环境破坏、生境片段化加剧, 大量物种灭绝或种群数量大幅下降, 从野外采集许多物种(尤其是濒危物种)的新鲜样本已越来越困难。幸运的是, 世界各国生物学家已经采集制作了大量的标本, 其中不乏系统收集的濒危物种样本。如果能充分有效地获得这些标本中所包含的遗传信息, 对于系统进化、生物多样性以及特定物种基因资源保护等方面的研究具有极其重要的意义。

福尔马林通过使组织蛋白及 DNA 等生物大分子迅速交联(Cross-linking), 在组织中产生一个稳定、紧密的交联网, 从而可以很好地保持生物体形态, 因而被广泛用于固定生物标本。从 20 世纪 80 年代起, 有很多学者开始尝试利用福尔马林固定标本中的 DNA 进行各种研究, 但是常常遇到以下问题, 如

DNA 难于提取; 或者提取 DNA 产量较小、片段较短; 或者获得的 DNA 难于进行 PCR 扩增, 且扩增片段长度往往有限。虽然固定过程中所发生的组织反应至今尚未被完全理解, 但是上述问题的出现与甲醛的作用是分不开的。研究发现甲醛可以使 DNA 和蛋白质, 尤其是和组蛋白产生共价键使得 DNA 释放出现困难^[1,2]; 生物大分子间的交联过甚可能会剪切核酸骨架, 导致 DNA 片段化; DNA 分子之间产生共价键阻碍有效扩增; 通过甲醛对 DNA 的碱基序列的修饰, 限制了可扩增片段的长度^[3,4]。针对上述福尔马林固定材料的特点, 众多学者对于标本 DNA 的提取扩增提出了一些改进方法, 例如 Fang 等建议用临界点干燥法处理福尔马林标本^[5], Kim and Chae 认为巢式 PCR(Nested-PCR)是针对 DNA 产量较少的福尔马林样品的一种灵敏性高的检测方法^[6]。这些方法上的改进使得标本 DNA 的有效利用成为可能。

收稿日期: 2004-08-02; 修订日期: 2004-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(30170142); 中国科学院重要创新方向项目(KSCX2-SW-118); 中国科学院创新领域前沿项目(220103)资助。

作者简介: 许黎美(1979—), 女, 汉族, 河北沧州人; 硕士; 主要从事鲸类保护遗传学研究。本研究得到了鲸类保护生物学学科组、鱼类系统与生物地理学学科组、浙江大学濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室和该实验室主任方盛国教授的诸多帮助, 在此一并致以诚挚的谢意。

通讯作者: 王丁, E-mail: wangd@ihb.ac.cn

但在本研究中发现, 这些方法单独使用效果均不理想, 所以作者尝试对现有福尔马林标本 DNA 的某些提取和扩增方法进行比较选择和综合利用来达到更好的效果。

白豚(*Lipotes vexillifer* Miller) 为中国特有的仅生存于长江中下游的淡水豚类。在过去的几十年中, 由于长江生境破坏加剧, 鱼类资源迅速减少, 白豚分布范围和种群数量迅速减少, 现存个体估计不足 100 头^[7,8], 在 IUCN 红皮书中被列为极危级 (Critically Endangered, CR)。虽然对白豚的饲养生物学、生理生化 and 行为生物学等各方面进行了很多研究, 但是对于这种极度濒危的物种的种群遗传学背景还知之甚少^[9]。在新鲜样本极难获得的情况下, 利用现有的白豚标本来了解这一物种的种群遗传学特征显得尤为重要。

本研究综合了现有文献的一些方法, 并对其进行了一些优化改进, 提出了综合实验方案, 从而成功提取了长期浸泡于福尔马林溶液中的白豚标本 DNA。线粒体 DNA 控制区(D-loop) 是种群遗传多样性研究中使用最普遍, 且较为有效的分子标记之一^[10,11]。在以上 DNA 提取的基础上, 进一步利用 D-loop 引物对标本 DNA 的部分序列进行了扩增、序列测定及分析, 获得了该物种遗传多样性的相关参数, 为白豚的保护和种群复壮提供了相关的遗传信息。

1 材料与方法

1.1 材料 用于本研究的标本材料为中国科学院水生生物研究所 30 年来 (1974—2002 年) 收集的长期在福尔马林中浸泡保存的 31 头白豚标本, 固定剂一般为没有经过缓冲的 10% 福尔马林溶液。最终成功测序个体所使用材料的取样部位如表 1 所示。

表 1 本研究白豚标本的不同取样器官

Tab 1 Different sampling organs of baiji specimens in this study

样本号 No. of specimens	取样器官 Sampling organs
Bf 1、2、3、4、5	肝 Liver
Bf 6、7、8、9、10	肾 Kidney
Bf 11	肺 Lung
Bf 12、13	心脏 Heart
Bf 14、15	子宫 Uterus
Bf 16	胰腺 Pancreas
Bf 17、18	肠 Intestine

续表

样本号 No. of specimens	取样器官 Sampling organs
Bf 19	胸鳍 Flipper
Bf 20	乳腺 Galactophore
Bf 21	甲状腺 Thyroid gland

1.2 标本的预处理 取不同个体的组织标本约 50mg, 用无菌剪刀剪碎, 分别使用以下 3 种预处理方法以去除甲醛: (1) 酒精梯度置换甲醛法, 参照 Fang 等^[5]的方法, 略加修改, 增加用 TE 8.0 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 漂洗浸泡的步骤。(2) GTE (100 mmol/L glycine, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 浸泡置换甲醛法^[12]。(3) 酒精梯度浸泡+ 临界点干燥法 (HITACHI HCP-2 临界点干燥仪)^[5]。

1.3 基因组 DNA 的提取和纯化 将预处理后的样品组织加入消化缓冲液 400 μ L 进行 56℃ 消化。消化缓冲液为 Tris 10mmol/L, EDTA 1 mmol/L, SDS 1%, DTT 20 mmol/L, 蛋白酶 K 20 μ L (20 mg/mL)。24 h 后视组织消化程度再加蛋白酶 K 适量, 消化时间也适当延长, 直至组织消化较彻底, 此过程中要不时缓慢颠倒混匀以利于充分消化。之后进行 DNA 常规酚氯仿抽提纯化, 再加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和两倍体积无水乙醇- 20℃ 沉淀 10 h 以上, 沉淀经 70% 乙醇洗涤、室温干燥后用 ddH₂O 溶解备用。对于经上述处理后还是难于 PCR 扩增的样品 DNA, 常用 DNA 纯化试剂盒 (Biostar) 对 DNA 进行一次纯化或用酒精多次洗涤。

1.4 PCR 扩增 PCR 扩增分别使用了两对线粒体 DNA 控制区引物, 一对为借用引物 L 和 H^[9], 因扩增效果不理想, 于是利用已测出的白豚“淇淇” D-loop 全序列 (个人资料) 设计另一对引物 LI5'-GACCAGTTAAAGCCCGTAT-3', HI 5'-AGGCCATAGCTGAGTCGA-3'。PCR 扩增体系总体积为 50 μ L: KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2 unit, dNTPs 200 μ mol/L, 模板 8 μ L, 另设一空白对照, 除以 ddH₂O 代替模板外, 其余组分相同。

1.4.1 引物 LI+ HI 的常规 PCR 扩增 常规 PCR 扩增 LI+ HI 反应采用 Touchdown PCR 程序扩增, 扩增参数为首先 94℃ 变性 4min, 接着进行 6 次循环, 每循环包括 94℃ 变性 1 min, 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 每循环退火温度降低 1℃ 直至 56℃, 再进行 35 个循环, 每循环包括 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火

30 s, 72℃延伸 1 min, 最后 72℃延伸 7 min。

1.4.2 引物 L1+ H1 的巢式 PCR 扩增 巢式 PCR 扩增 L1+ H1, 第一轮扩增用自行设计的外引物 F+ R (F 5'-ATTTGTCCATACGACCAGTT-3', R5'-TTG-GTTGTGCTAGTCCAATG 3'), PCR 扩增反应总体积减为 25 μ L, 模板减为 4 μ L, 其他组分终浓度同上。PCR 扩增参数为 94℃变性 4 min, 之后进行 30 个循环, 每循环包括 94℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 最后 72℃延伸 7 min。然后取 1 μ L 一次扩增产物(视一次 PCR 产物的量进行模板稀释)作为模板进行引物 L1+ H1 的二次扩增, 扩增体系及扩增参数同上面 L1+ H1 常规 PCR 扩增。

1.5 PCR 产物纯化及测序 PCR 产物用 Biostar 的割胶回收试剂盒进行割胶纯化回收后, 送至上海生物工程技术公司进行直接 PCR 产物序列测定(测序仪为 ABI 377)。

2 结果

2.1 福尔马林固定标本 DNA 提取 利用上述预处理、消化、纯化步骤共提取出 21 头白 豚的基因组 DNA, DNA 片段长度的范围从 200 bp 到约 10 kbp。

通过实验证实, 3 种预处理方法都能有效地从固定标本中提取 DNA。虽然从酒精梯度+ 临界点干燥处理的标本中提取的 DNA 质量和产量最高, 但由于第一种预处理方法简便易行且 DNA 产物基本满足扩增需要, 大部分样本均采用此方法处理。

图 1 为部分白 豚标本的 DNA(均为经第一种预处理获得) 0.8% 琼脂糖凝胶电泳图。由图中可以看出, 固定标本的 DNA 大多数降解严重, 但也有部分个体保存较好(约可达 10 kbp)。

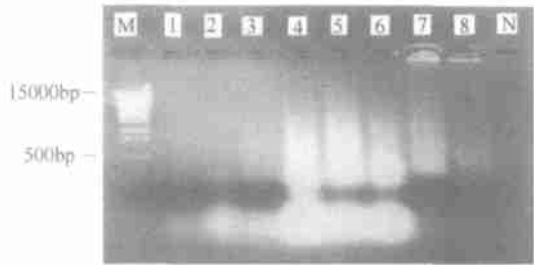


图 1 从福尔马林固定白 豚标本中提取 DNA 电泳检测图
Fig. 1 Genomic DNA extracted from formalin fixed baiji tissues run onto agarose gels
M 示 DNA 分子量标记 DL2000+ DL 15000; 固定起始时间 1—6: 1983—1988 7: 1982 8: 1979; N 示阴性对照
Lane M indicates the molecular weight size marker DL 2000+ DL 15000. Lanes 1—6 fixation dates of tissues were between 1983 and 1988; lane 7: 1982; lane 8: 1979; Lane N: negative control.

图 2 比较了优化消化过程前后 DNA 的提取效果, 随着消化时间的延长(由 24 h 增至 64 h)和蛋白酶 K 浓度的增高(由 0.5 mg/mL 增至 1.0 mg/mL), 除了第三个标本(c 和 c') 始终无 DNA 出现外, 其他三个标本提取的 DNA 产量均明显增高, 同时 DNA 的片段长度也明显增加。但是酶浓度和消化时间的最优条件应该是根据不同组织而有所差异, 对于肝肾组织采用 0.5 mg/mL 蛋白酶 K 在 56℃消化 24 h 就能将组织块消化较彻底, 但是对于肺、肌肉这些含基质较多的组织, 往往需要 1.0 mg/mL 进行 48—72 h 才可以得到较多的 DNA 量。

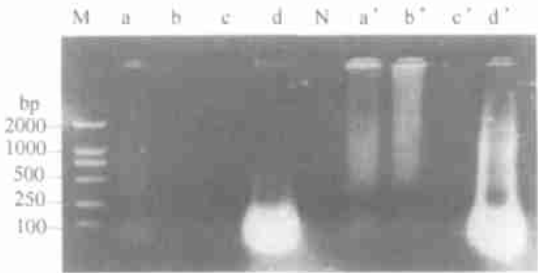


图 2 改进福尔马林固定白 豚标本 DNA 提取方法前后的效果比较
Fig. 2 Comparison of genomic DNA extracted from formalin fixed baiji tissues by different digestion protocols
M 示 DNA 分子量标记 DL 2000; a d 示四个不同年代的标本经 24h 蛋白酶 K(终浓度 0.5mg/mL) 消化后所提取 DNA(均采用第一种预处理方法); a' d' 示对应上面四个标本经 64h 和蛋白酶浓度加倍消化处理后 DNA 提取效果; N 示阴性对照
Lane M indicates the molecular weight size marker DL 2000. Lanes a d indicate DNA extracted by 24 h proteinase K(0.5mg/mL) digestion. Lanes a' d' indicate DNA of four specimens extracted by 64 h proteinase K(1.0mg/mL) digestion. Lane N indicates the negative control

标本 DNA 经常会遇到电泳检测有 DNA 但扩增失败的情况, 这时可采用 70% 乙醇多次漂洗或者使用试剂盒进行 DNA 再次纯化, 经过这样的操作后几乎都能成功扩增。固定标本 DNA 的严重降解会形成大量的小分子量 DNA, 为了有效地回收这些小片段, 延长 DNA 的沉降时间, 无水冷乙醇- 20℃沉淀 10 h 以上能得到满意的效果。

2.2 福尔马林固定标本 DNA 的 PCR 扩增

利用借用引物 L 和 H(550 bp) 扩增, 新鲜样本可得到较亮的目的条带, 由福尔马林标本提取的 DNA 无扩增产物或出现非特异扩增。使用新设计引物 L1 和 H1(410 bp) 后, 新鲜样本和福尔马林标本 DNA 扩增均得到明亮且特异性好的条带。线粒体控制区 410 bp 片段 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示。

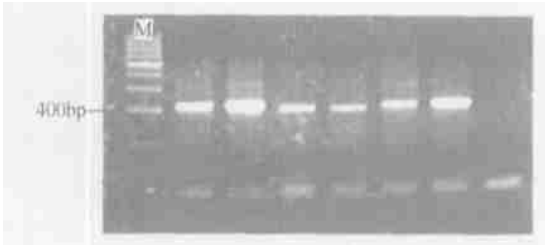


图 3 福尔马林固定白 豚标本线粒体 DNA 控制区 410bp 片段 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 The 410 base pair fragment of the mitochondrial control region from DNA extracted from formalin fixed baiji tissues

M 示 DNA 分子量标记 200bp ladder Lane M indicates the molecular weight size marker 200 bp ladder

部分样品 DNA 质量较差, 采用常规扩增无条带出现, 改用巢式 PCR 扩增。图 4 为部分 DNA 样品采用常规和巢式两种扩增方法扩增 L1+ H1, 并将所得 PCR 产物分别取 5 μ L 用 1% 琼脂糖检测的效果图。从图中可以看出, 常规扩增成功率很低的样品经过巢式扩增, 不仅扩增成功率明显提高, 扩增产物的特异性也明显增强, 而且也大大节省了模板的用量。

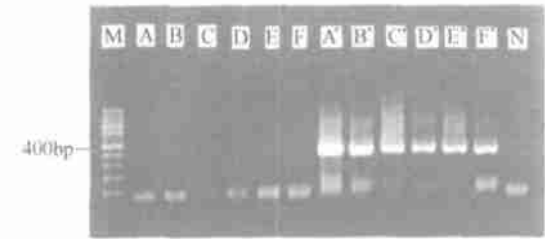


图 4 采用常规 PCR 和巢式 PCR 扩增效果比较电泳图

Fig. 4 Comparison of different amplification results by conventional PCR and nested PCR

A-F 示 6 个标本采用常规 PCR 扩增 H1+ L1; A'-F' 示 6 个标本改用巢式 PCR 扩增 H1+ L1; M 示 DNA 分子量标记 100 bp ladder; N 示阴性对照

Lanes A-F indicate 6 specimens amplified by conventional PCR. Lanes A'-F' indicate the same 6 specimens amplified by nested PCR. Lane M indicates the molecular weight size marker 100 bp ladder. Lane N indicates the negative control

2.3 序列测定与多样性分析

测定并比对了 21 头白 豚个体线粒体控制区接近中间区段 320 bp 的序列(即 Liu 等所测得的白 豚线粒体 DNA 控制区全序列 921 bp 编码的 251—570 bp^[9])。所有个体在这一区段都具有相同的序列, 为同一单倍型。

3 讨论

3.1 福尔马林标本 DNA 提取及 PCR 扩增 从图 1 可以看出, 1979 年和 1982 年样本的 DNA 分子量可达约 10 kbp 并且可以稳定扩增, 从图中看不出固定

时间长短与 DNA 质量之间存在着必然联系。从已发表文献来看其他物种标本固定时间从 1—7 d 到 70 d, 甚至是 1946 年都有成功提取并扩增的报道^[13—15], 这也在一定程度上表明固定时间不是影响标本 DNA 有效利用的关键因素。Kosel and Graeber 发现标本 DNA 在开始固定的前几个星期内降解严重, 以后则趋于稳定^[16]。他们认为这可能是由于经过几星期的福尔马林固定, 蛋白质之间以及蛋白质和 DNA 之间的交联已完成的缘故, 经过这个极限之后的时间长短并不太影响 DNA 的质量。

相比于 1979 年和 1982 年的标本 DNA, 20 世纪 80 年代的大多数标本的 DNA 降解严重, 长度基本集中于 200—2000 bp 之间, 说明标本 DNA 保存好坏可能更多地依赖于标本本身的新鲜程度和固定条件, 如福尔马林溶液的浓度、pH、固定液的温度等。Koshiba 等发现福尔马林固定过程中的 DNA 降解, 主要是由于固定温度高, pH 低以及甲酸(甲醛氧化成为甲酸)的存在所致^[2]。通过应用缓冲福尔马林和低温下固定(4 $^{\circ}$ C), 可以明显改善 DNA 保存质量。Noguchi 等也证实了在 4 $^{\circ}$ C 下固定或者室温下含有 5 mmol/L EDTA 的福尔马林固定都比室温下直接用福尔马林固定非常明显地保存了更大分子量 DNA^[17]。

从 20 世纪 80 年代开始, 福尔马林固定标本的利用越来越引起各专业学者的兴趣, 其中也有很多成功提取 DNA 并扩增的事例, 但大都是针对福尔马林短时固定后石蜡包埋标本所进行的研究。根据长期浸液固定标本本身的特点, 本研究对一些步骤进行了优化改进, 最终达到稳定地提取并扩增测序了 21 头白 豚的线粒体 DNA 控制区。综合来说, 主要有以下几点: (1) 对标本进行了预处理尽量去除固定标本中残存的甲醛。三种方法中临界点干燥法在扩增时具有明显优势, 可能是甲醛去除更彻底的原因。(2) 进行高强度的蛋白消化可能更有利于打破组织内由于甲醛固定产生的交联, 从而使 DNA 能更有效地释放。(3) 在固定标本的 DNA 沉淀过程中经常会有一些抑制物同时沉积下来, 因此多次纯化对某些标本是必要的, 考虑到在 DNA 沉淀时固定标本中的痕量 RNA 可以充当载体以提高 DNA 沉淀效率的作用^[18], 在本实验中没有加 RNA 酶对 DNA 提取物进行处理。(4) 设计特异性好并且长度合适的引物。由于标本 DNA 本身的降解、碱基修饰等原因限制了可扩增片段的长度, 本研究选择 500 bp 左右并且特异于白 豚的引物。试验证明这样不仅增加了 PCR

扩增反应的敏感性,同时也降低了实验室外源 DNA 污染的可能。(5)巢式 PCR 可减弱标本 DNA 提取物的抑制效应使 PCR 反应顺利进行,使用巢式引物进行连续多轮扩增提高了扩增的特异性和灵敏度,部分质量较差的 DNA 样品采用此方法扩增并测序。但是受福尔马林本身 DNA 质量的限制设计外引物时片段不能太长,特异性好的内引物也是成功扩增的保证。此方法极易造成携带式污染(Carry over contamination),所以在使用这种扩增方式时两次扩增反应操作区域应严格区分,还要严格控制空白对照。通过上述的方法合理和综合运用,可以达到福尔马林固定白豚标本 DNA 稳定的提取并扩增。

有效的核酸提取方法是开展分子生物学研究的前提,但是对于不同的标本、同一标本的不同组织,或不同保存条件的材料,在提取 DNA 时都可能会出现难以预料的问题。虽然目前已经发表了很多提取福尔马林固定标本 DNA 的方法,但是迄今为止还没有一种通用的提取方法适用于所有的福尔马林固定标本 DNA 提取。因而不同的标本应根据标本保存状态和不同的实验目的选取不同的提取方法,并且全面综合考虑整个实验的各个环节,才能保证研究的顺利进行。比如以福尔马林固定石蜡包埋组织作为 DNA 提取材料,因为这种材料经过短时固定,在石蜡包埋之前已经用酒精将组织中的甲醛尽量去除,就无需对材料进行甲醛去除的预处理操作。如果本身 DNA 保存较好,降解不严重,则长时酒精沉淀和考虑加入共沉剂也就显得没有必要。由于肝部组织含有较多的代谢产物,成分复杂,其 DNA 模板要比肺部组织 DNA 经过更多次数的洗涤纯化才能适于扩增。在整个提取扩增过程中,每一步都要针对不同的标本情况选取合适的方法,当然这个最适方法很多时候是需要实验中不断摸索才能确定的。

对于福尔马林固定过程中是否会造成 DNA 双链碱基的突变而影响标本 DNA 的序列可信度问题,很多文章进行了研究。有研究发现保存于福尔马林的标本 DNA 已受到损伤,克隆后测序易产生人工产物^[19],而直接测序扩增样品应该可以克服这个问题,因为大量的一致序列掩盖了这种随机发生的突变。France and Kocher 发现福尔马林固定标本 DNA 的 PCR 产物直接测序的序列与新鲜样本比较并没有发生修饰,可以作为一个有效的 DNA 序列的来源^[20]。然而 Williams 等则指出福尔马林标本 DNA 序列即使用直接测序的方法也发现了很高的人工突

变^[21],经过分析是固定过程中产生的,并认为这种固定材料的 DNA 在应用于序列及突变分析时应慎重。本文通过对几个样品进行多次 DNA 提取和 PCR 产物直接测序得到的序列结果一致,证实直接测序得到的福尔马林固定标本的序列是比较可靠的。

3.2 白豚遗传多样性初步分析

本研究所测序的 21 个个体在 D-loop 已测序区段都具有相同的序列,为同一单倍型。虽然鲸类总体上遗传变异较低,其中濒危物种则更加明显,但这种序列完全一致的现象即使在濒危物种中也是很少见的。Yang 等在 73 头江豚(*Neophocaena phocaenoides* Cuvier)的 720bp 线粒体 DNA D-loop 序列中,发现了 13 个变异位点,定义了 17 种单倍型,平均每 55 bp 有一个变异位点,每 5 个个体可检测到 1 种新的单倍型^[22]。而濒危的北黑露脊鲸(*Eubalaena glacialis* Muller)的 180 个个体的 500 bp D-loop 片段中也发现了 5 种单倍型^[23],只有被 IUCN 同列为极度濒危物种的小头鼠海豚(*Phocoena sinus* Norris and McFarland),在测定了其 43 个个体的 D-loop 5'端 322 bp 片段后,发现 43 个个体的序列完全一致^[24]。这个结果表明,珍稀濒危物种的濒危程度与其低遗传多样性水平关系密切,可能是造成和加剧其濒危程度的重要原因。

本文所发现的白豚具有如此低的遗传多样性,可能由以下几个原因:1) 20 世纪以来,白豚分布区大幅缩小,数量迅速减少,以及种群内不可避免的近交可能导致遗传多样性丢失;2) 白豚种群建群时创始者数量较少而形成的奠基者效应,或者是在较远历史时期所经历的瓶颈效应造成了遗传多样性低这一历史特征;3) 标本采集区域有限,使得低频等位基因在取样数量有限的情况下往往检测不到。本文的标本来源基本集中于长江中游江段,Liu 等在对 20 头长江中下游白豚个体的线粒体 DNA 的同一片段的分析中发现了两个变异位点和 3 种单倍型,但不同单倍型的比例相差较大,分别为 5%,30% 和 65%^[9]。他们所发现的比例最大的单倍型与本文所测得的单倍型序列一致,在本研究的标本中没有发现另两种比例较低的单倍型。这在一定程度上说明下游江段个体可能蕴含更多的遗传变异。

目前,白豚无论是在生态学上还是在遗传学上,都面临着极高的灭绝危险,加快制定有效的措施加大对白豚的保护已刻不容缓。鉴于白豚长江生境的严重破坏,很多专家提出了实施迁地保护的措施^[7,8]。本研究结果证实白豚的遗传多样性十

分贫乏,在其数量极少、栖息地片段化十分严重的情况下,确有必要尽快实施迁地保护并在可能的条件下实现人工繁殖。根据本文和 Liu 等的研究结果^[9],建议实行迁地保护时要考虑有目标的捕捉下游个体使其相对较丰富的遗传变异得到迅速扩增。同时在考虑就地保护措施时应加强不同栖息地片段之间通道的保护,增加散布于各栖息地片段个体交配和繁衍后代的机会,从而最大限度地保持白 豚种群尚存的遗传多样性。

参考文献:

- [1] Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross linking agent [J]. *Cell*, 1978, **15**: 945—954
- [2] Koshihara M, Ogawa K, Hamazaki S, *et al.* The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high molecular weight DNA from fixed and embedded tissues [J]. *Pathology Research and Practice*, 1993, **189**: 66—72
- [3] Paabo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA [J]. *Nature*, 1985, **314**: 644—645
- [4] De Giorgi C, Sialer M F, Lamberti F. Formalin induced infidelity in PCR amplified DNA fragments [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1994, **8**: 459—462
- [5] Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. Formalin removal from archival tissue by critical point drying [J]. *Biotechniques*, 2002, **33**: 604, 606, 608—610
- [6] Kim J, Chae C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin fixed paraffin embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization [J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, **92**: 105—111
- [7] Liu R, Zhang X, Wang D, *et al.* Once again studies on the conservation of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Valley*, 1996, **5**: 220—225 [刘仁俊, 张先锋, 王丁, 等. 再论白 豚和江豚的保护. 长江流域资源与环境, 1996, **5**: 220—225]
- [8] Zhang X, Wang D, Liu R, *et al.* The Yangtze River dolphin or baiji (*Lipotes vexillifer*): Population status and conservation issues in the Yangtze River, China [J]. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2003, **13**: 51—64
- [9] Liu S, Yang G, Ji G, *et al.* Genetic diversity of baiji: mtDNA evidence [J]. *Biological Diversity (Hong Kong)*, 2001, **3**: 92—95. [刘珊, 杨光, 季国庆, 等. 白 豚种群遗传多样性分析: mtDNA 证据. 生物多样性 (Biological Diversity, 香港), 2001, **3**: 92—95]
- [10] Baker C S, Perry A, Bannister J L, *et al.* Abundant mitochondrial DNA variation and world wide population structure in humpback whales [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**: 8239—8243
- [11] Hoelzel A R, Halley J, Ó Brien S J, *et al.* Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks [J]. *Journal of Heredity*, 1993, **84**: 443—449
- [12] Shedlock A M, Haygood M G, Pietsch T W, *et al.* Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin fixed museum specimens [J]. *Biotechniques*, 1997, **22**: 394—396, 398, 400
- [13] Shibata D, Kurosu M, Noguchi T T. Fixed human tissues: a resource for the identification of individuals [J]. *Journal of Forensic Sciences*, 1991, **36**: 1204—1212
- [14] Wiegand P, Domhovey J, Brinkmann B. DNA degradation in formalin fixed tissues [J]. *Pathologie*, 1996, **17**: 451—454
- [15] Savioz A, Blouin J L, Guidi S, *et al.* A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years [J]. *Acta Neuropathologica*, 1997, **93**: 408—413
- [16] Kosel S, Graeber M B. Use of neuropathological tissue for molecular genetic studies: parameters affecting DNA extraction and polymerase chain reaction [J]. *Acta Neuropathologica*, 1994, **88**: 19—25
- [17] Noguchi M, Funaya S, Takeuchi T, *et al.* Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses [J]. *Pathology International*, 1997, **47**: 685—691
- [18] Diaz Cano S J, Brady S P. DNA extraction from formalin fixed, paraffin embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high quality DNA [J]. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1997, **6**: 342—346
- [19] Quach N, Goodman M F, Shibata D. *In vitro* mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR [J]. *BMC Clinical Pathology*, 2004, **4**: 1
- [20] France S C, Kocher T D. DNA sequencing of formalin fixed crustaceans from archival research collections [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, **5**: 304—313
- [21] Williams C, Ponten F, Moberg C. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens [J]. *American Journal of Pathology*, 1999, **155**: 1467—1471
- [22] Yang G, Ren W, Zhou K. Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters, inferred from mitochondrial control region sequences [J]. *Marine Mammal Science*, 2002, **18**: 336—347
- [23] Malik S, Brown M W, Kraus S D, *et al.* Analysis of mitochondrial DNA diversity within and between north and south Atlantic right whales [J]. *Marine Mammal Science*, 2000, **16**: 545—558
- [24] Rosel P E, Rojas Bracho L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered Vaquita *Phocoena sinus* Norris and Macfarland, 1958 [J]. *Marine Mammal Science*, 1999, **15**: 990—1003

DNA EXTRACTION FROM FORMALIN-FIXED TISSUES AND GENETIC DIVERSITY OF BAIJI (*LIPOTES VEXILLIFER*)

XU LiMei^{1,3}, WAN QiuHong² and WANG Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. The Key Laboratory of Conservation Genetic and Reproductive Biology for Endangered Wild Animals of the Ministry of Education, Hangzhou 310029;

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: Archival, formalin fixed tissue is an invaluable resource for molecular genetic study, but the utilization of nucleic acid of formalin fixed tissue is generally problematic. Because of the negative effect of formalin on proteinase K and Taq DNA polymerase, the cross linking between proteins and DNA, DNA degradation and other reasons, in order to successfully extract and amplify DNA from formalin fixed tissue, formalin removal, intensive protein digestion, DNA purification, and PCR optimization should all be considered. In this study, we report an integrated and modified protocol to efficiently extract and amplify DNA from baiji (*Lipotes vexillifer*) tissues, which were stored in unbuffered formalin for years. We used three pretreatment methods to remove formalin: gradual dehydration by alcohol, GTE buffer displacement and critical point drying, by comparison the DNA from samples treated by critical point drying is the best in quality and quantity. Intensive proteinase K treatment including increased proteinase K concentration and prolonged digestion time also greatly enhances quality and quantity of DNA. Because DNA from unbuffered formalin fixed tissue was heavily degraded, a DNA target size of approximately 500bp or smaller was found to be optimal for PCR amplification, in addition nested PCR can greatly increase the positive results of amplification. As a result, DNA of 21 baiji specimens were successfully extracted and partial control region of mitochondrial DNA were amplified and sequenced. All the specimens have identical sequences, which indicates very low genetic diversity of baiji.

Key words: DNA extraction; Formalin-fixed tissues; Genetic diversity; Baiji